

127
 Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference H1-004PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/JP99/04549	International filing date (day/month/year) 24 August 1999 (24.08.99)	Priority date (day/month/year) 17 September 1998 (17.09.98)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/00		
Applicant HELIX RESEARCH INSTITUTE		

<p>1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.</p> <p>2. This REPORT consists of a total of <u>3</u> sheets, including this cover sheet.</p> <p><input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).</p> <p>These annexes consist of a total of _____ sheets.</p>
<p>3. This report contains indications relating to the following items:</p> <p>I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report</p> <p>II <input type="checkbox"/> Priority</p> <p>III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability</p> <p>IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention</p> <p>V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement</p> <p>VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited</p> <p>VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application</p> <p>VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application</p>

Date of submission of the demand 13 April 2000 (13.04.00)	Date of completion of this report 09 August 2000 (09.08.2000)
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04549

I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:*

- ☒ the international application as originally filed
- ☐ the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the claims:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, as amended (together with any statement under Article 19
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the drawings:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____
- ☐ the sequence listing part of the description:
 pages _____, as originally filed
 pages _____, filed with the demand
 pages _____, filed with the letter of _____

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language _____ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).**

* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

** Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP99/04549

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-19	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

Claims 1-19

The subject matter of claims 1-19 is not disclosed in any of the documents cited in the ISR, and is thus considered to be novel and to involve an inventive step.

In particular, the point whereby the 5'-terminal side of the sense strand cDNA is immobilized on the solid phase is neither disclosed in any of the documents cited in the ISR, nor is considered that said point could easily be conceived of by a person skilled in the art.

明細書

固定化 cDNA ライブラリー

技術分野

本発明は、cDNA ライブラリーならびにその合成方法、これを鋳型とする RNA あるいは RNA ライブラリー、更にはタンパク質ライブラリーの調製法に関する。

背景技術

分子遺伝学的なアプローチの手法の一つに、mRNA を鋳型として逆転写した cDNA を材料に用いる方法が古くから行われている。cDNA を用いることにより、実際に細胞の中で発現している遺伝子の状態を把握することができることから、遺伝情報そのものであるゲノムを材料とするアプローチと並んで重要な研究手法であると言える。

cDNA を研究材料とする場合には、一般に mRNA をもとに合成した cDNA ライブラリーを作成する。cDNA ライブラリーには、mRNA の状態をできるだけ正確に反映していること、その後のクローニングやスクリーニングを進めやすいこと、といった条件を満たすことが求められる。mRNA の状態の反映とは、もとの細胞における mRNA のポピュレーションを維持していることを意味する。たとえば発現の弱い遺伝子が、cDNA の合成やライブラリーの複製にあたって失われてしまうことがあっては、効率的な研究を進めることはできない。更に、鋳型となる RNA の抽出や cDNA の合成に当たって、mRNA の全長をきちんと写し取っているかどうかはライブラリーの質を左右する重要な要素となる。遺伝子が途中で切断されてしまうと、特に遺伝子から転写されたタンパク質を指標にスクリーニングを進める場合に大きな障害となる可能性がある。一方、クローニングやスクリーニングの操作性とは、たとえばクローニング用ベクターへの組み込みが容

易であるとか、ある程度の量のタンパク質として迅速に発現させることが可能といった特徴を持つことが挙げられる。

いくつかの代表的な cDNA ライブラリーの合成方法が普及している。mRNA の 3'側に共通して存在するポリ(A)という A (アデニン) が連続した部分を利用して、逆転写酵素により第 1 鎖 cDNA を合成するのが一般的である。第 1 鎖合成後のクローニング方法については、いろいろな工夫が行われている。通常は第 1 鎖を鋳型として第 2 鎖を合成して 2 本鎖とする一方、何らかの手段によって cDNA の末端に制限酵素サイトを付加し、適当なベクターに組み込んでベクターライブラリーを得る方法がとられる。すなわち、オリゴ dT プライマーによって増幅した第 1 鎖を Gubler-Hoffman 法やランダムプライマーにより 2 本鎖とし、その 5'末端を平滑化してアダプターをライゲーションする。これを制限酵素処理してベクターのクローニングサイトに挿入し、ベクターライブラリーとする。ベクターには、 λ gt11 等のファージベクターや blue script (商品名) 等のプラスミドベクターが利用される。

以上のような方法では、mRNA の 5'側が必ずしも完全に cDNA として合成できるとは限らないという問題があった。たとえばランダムプライマーを使って 2 本鎖とした場合には、もとの mRNA の 3'ポリ(A)側に偏った短い配列が生成されやすくなる。Gubler-Hoffman 法は、第 1 鎖 cDNA とハイブリダイズしている鋳型となった mRNA に RNaseH でニックをいれ、これを複製起点として第 2 鎖 cDNA を合成する方法で、比較的鎖長の長い cDNA を得やすいとされている。

更に完全長 cDNA を含んだベクターライブラリーをより効率的に得る方法として、5'末端にターミナルトランスフェラーゼを使って C 連鎖を付加し、直接ベクターに組み込めるようにした Okayama-Berg 法(Okayama, H. Berg, P.: High-efficiency cloning of full-length cDNAs. Mol. Cell Biol., 2:161-170, 1982)も公知である。この他、mRNA の 5'側に合成したオリゴヌクレオチドを特異的に導入し、この部分に相補的なプライマーを使って 2 本鎖 cDNA を合成することによって完

全長 cDNA を得ようという試みも報告されている(Maruyama, S. and Sugano S. Oligo-capping: A simple method to replace the CAP structure of eucaryotic mRNAs with oligonucleotides. Gene 138 (1994): 171-174, Merenkova, N. et al. Method for the specific coupling of the CAP of the extremity 5' of a fragment mRNA and preparation of complete cDNA. PCT/FR96/00 651,1996)。これらの方法によれば、mRNA の 5'側末端に存在する CAP 構造が特異的に人為的なオリゴヌクレオチドに置換される。そしてこのオリゴヌクレオチドに相補的な配列を第 2 鎖 cDNA 合成の複製起点とすることにより、原理的には mRNA の 5'末端領域の配列を含む cDNA が得られることになる。しかしこのような方法によって得られる 1 次ライブラリーに含まれる完全長 cDNA の数は少なく、cDNA ライブラリーとしての多様性を維持したまま、それをマスターライブラリーとして完全長 cDNA ライブラリーを増幅することは困難であった。

以上の方法によれば、mRNA から cDNA ベクターライブラリーを得ることになる。この他に、cDNA を固定化することも行われている。固定化 cDNA ライブラリー法では、オリゴ dT プライマーを固相に固定化した状態で利用する、固定化オリゴ dT プライマー法(Mitsuhashi,M.Gene manipulation on plastic plates. Nature 357(1992):519-520)が公知である。試料中の mRNA を固定化オリゴ dT プライマーで捕捉できることから、他の方法では必須となっている RNA の抽出操作が不要となる。捕捉された mRNA を鋳型として、逆転写酵素により第 1 鎖が合成される。オリゴ dT プライマーは固定されているので、このとき合成される第 1 鎖もまた固定化されている。すなわち、ここで得られる cDNA ライブラリーは、アンチセンス鎖 5'固定化 cDNA ライブラリーとなる。得られた第 1 鎖をプライマリーライブラリーとすれば、PCR によって合成した二次的な cDNA ライブラリーとの分離が容易であり、しかも第 1 鎖は再利用が可能である。Solid Phase cDNA Synthesis Kit (寶酒造製、商品名) は、固定化 cDNA ライブラリー法に必要な試薬類をパッケージにしたキットである。

しかしアンチセンス鎖（第1鎖）の5'端を固定化した cDNA ライブラリーにおいては、不完全長 cDNA が多く含まれるという問題点がある。固定化オリゴ dT プライマーによって固相上に合成される第1鎖 cDNA は、理論的にはポリ(A)を有する mRNA の全てを逆転写したものとなる。しかしオリゴ dT で選択される現実の mRNA は、その 5'側において不完全な長さを持つものも多く含んでいる。通常の条件では、完全長 mRNA が mRNA 全体に占める割合は低い。完全長 mRNA の割合は、mRNA が由来する試料の種類や状態、あるいは抽出条件によっても変動するが、いずれにせよ不完全な長さのものが大部分を占める。したがって、固定化オリゴ dT プライマーによって固定化された cDNA ライブラリーを構成する cDNA の大部分は、不完全な配列を写し取ったものになってしまう。そのうえ、たとえ mRNA が完全長であったとしても cDNA の合成がその 5'末端まで完全に行われるとは限らないため、ますます完全長 cDNA の割合は小さくなる。

それでも mRNA の全てを捕捉できれば、mRNA のポピュレーションの反映という条件を満たすことはできる。更に前述の完全長 cDNA を得るための方法と組み合わせれば、完全長 cDNA に富む固定化ライブラリーの提供も期待できるかもしれない。ところが現実には、第1鎖 cDNA の 5'側（mRNA の 3'側に相当する）を固定化する方法では完全長 cDNA を選択的に固定化することができないので、固定化 cDNA ライブラリーにおける完全長 cDNA の構成比率を高めることにはつながらないのである。

更に公知の固定化オリゴ dT 法においては、固定化した第1鎖 cDNA をマスターライブラリーとして2次的な cDNA ライブラリーを得ることが難しいという問題点を有していた。たとえばランダムプライマーによって第2鎖を合成した場合には、短い断片にポピュレーションが偏ったライブラリーとなりやすい。あるいはオリゴ CAP 法との組み合わせによって完全長 cDNA をある程度含む状態にあるとしても、固定化される cDNA に占める完全長 cDNA の割合が低いため、2次的なライブラリーに高い品質（すなわち完全長 cDNA の多様性）の維持は期待で

きない。

ところで、センス鎖 cDNA の上流に、T7 プロモーター、T3 プロモーター、SP6 プロモーター配列など、インビトロでの RNA 合成を可能にするプロモーター配列を配置することにより、cDNA を鋳型としてインビトロで RNA を合成する技術が公知である。これを固定化 cDNA ライブラリーに応用すれば、RNA ポリメラーゼを利用してインビトロで mRNA のライブラリーを合成することができることになる。しかし第 1 鎖 cDNA の 5'側を固定化した場合には、先に述べたとおり mRNA の 5'側に相当する部分（翻訳開始点を含む側）を含んだ cDNA の割合が低いため、高い効率でのタンパク質への翻訳は期待できない。

発明の開示

本発明の課題は、新規な構造を備えた固定化 cDNA ライブラリーを提供することである。すなわち本発明の課題は、センス鎖 cDNA の 5'末端側を固相上に固定化した cDNA を提供することにある。あるいはその技術を利用して、cDNA ライブラリーを提供することも本発明の課題である。

加えて本発明の望ましい態様においては、完全長 cDNA の割合が高く、またその cDNA のポピュレーションを 2 次的なライブラリーにおいてより忠実に反映させることが可能なプライマリーライブラリーとして有用な、良質なセンス鎖 5'固定化 cDNA ライブラリーの提供を課題としている。更に本発明の別の態様においては、センス鎖 cDNA 上流への RNA ポリメラーゼプロモーター等任意の遺伝子配列を付加することができるセンス鎖 cDNA ライブラリーの提供を課題とする。

本発明者らは、第 1 鎖 cDNA（アンチセンス鎖）の 3'末端に人為的な塩基配列を付加し、この塩基配列を利用することによって前記課題を達成できるのではないかと考えた。つまり、あらかじめこの人為的な塩基配列に相補的な配列を 3'末端側を含む合成オリゴヌクレオチドの 5'末端側を固相に固定化しておき、この合成オリゴヌクレオチドとのハイブリダイズにより、第 1 鎖 cDNA を捕捉すること

ができる。この状態で固定化合成オリゴヌクレオチドをプライマーとし、捕捉された第1鎖(アンチセンス鎖)cDNAを鋳型に第1鎖の3'→5'の向きに第2鎖(すなわちセンス鎖)cDNA合成反応を行えば、任意のcDNAをセンス鎖の5'末端側を固定化した形で固相上に合成することが可能となる(図1)。

更に本発明者らは、センス鎖(すなわち第2鎖)の5'側の固定化を実現することによって様々な効果が期待できることを見出した。すなわち、たとえば本発明によるcDNAの合成方法をcDNAライブラリーの合成に応用することによって、原理的には完全長cDNAのみで構成される理想的なcDNAライブラリーの提供が可能となることを見出し本発明を完成した。あるいはまた、センス鎖5'側への人為的な塩基配列の付加を実現したことによって、固定化cDNAライブラリーにおけるセンス鎖の上流への任意の塩基配列の配置を可能とし、新規なcDNAライブラリーの用途を見出した。すなわち本発明は、以下のcDNAライブラリー、ならびにその製造方法と用途に関する。

- (1) センス鎖cDNAの5'側が固定されているcDNAライブラリー。
- (2) センス鎖cDNAの5'末端に、そのライブラリーを構成するcDNAに共通の塩基配列が存在する(1)に記載のcDNAライブラリー。
- (3) 前記共通の塩基配列が、RNAポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターのセンス配列である(2)に記載のcDNAライブラリー。
- (4) 前記共通の塩基配列が、任意のアミノ酸配列をコードするものであり、この塩基配列とcDNAとが同じ読み取り枠を構成する(2)に記載のcDNAライブラリー。
- (5) センス鎖cDNAが翻訳開始コドンを含む(1)に記載のcDNAライブラリー。
- (6) 翻訳開始コドンがmRNAに由来するものである(5)に記載のcDNAライブラリー。
- (7) 以下の工程を含むcDNAの合成方法であって、第1鎖cDNAが3'末端に

人為的に付加した既知の塩基配列を備え、第2鎖合成用プライマーとするオリゴヌクレオチドがその5'側において固相に結合したものであるcDNAの合成方法。

a) 第1鎖cDNA合成用プライマーによりmRNAを鋳型としてcDNAの第1鎖を合成する工程、

b) 工程a)によって生成する第1鎖cDNAの3'側に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを第2鎖合成用プライマーとしてセンス鎖cDNAを合成する工程、

(8) 第1鎖cDNAの3'末端に付加する配列が、以下の工程によって付加されたものである(7)に記載のcDNAの合成方法。

a) mRNAの5'末端に既知の配列を持つオリゴヌクレオチドを結合する工程、

b) 工程a)のmRNAを鋳型とし第1鎖合成用プライマーによって第1鎖cDNAを合成する工程、

(9) 前記工程a)において、mRNAの5'末端に存在するCAP構造を特異的に認識する方法によって前記オリゴヌクレオチドを結合する(8)に記載のcDNAの合成方法。

(10) (7) - (9)のいずれかに記載の方法によって得ることができるセンス鎖5'固定化cDNA。

(11) mRNAを材料として(7) - (9)のいずれかに記載のcDNAの合成方法を実施することによってcDNAライブラリーを合成する方法。

(12) (11)に記載の方法によって得ることができるセンス鎖5'固定化cDNAライブラリー。

(13) mRNAを材料として(9)に記載のcDNAの合成方法を実施することによって得ることができる完全長cDNAを含むcDNAライブラリー。

(14) (12)または(13)に記載のcDNAライブラリーを増幅することに

よって得ることができる、2次的 cDNA ライブラリー。

- (15) (3) の cDNA ライブラリーを鋳型として、前記 RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーター配列を認識する DNA 依存型 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成し、mRNA ライブラリーを得る方法。
- (16) (15) に記載の方法により得ることができる、mRNA ライブラリー。
- (17) (16) に記載の mRNA ライブラリーを発現システムに適用することによってタンパク質に翻訳する工程を含むタンパク質ライブラリーの調製方法。
- (18) (17) に記載の方法によって得ることができるタンパク質ライブラリー。
- (19) 下記の工程 a) - c) を含む cDNA のサブトラクション法
- a) テスターとする cDNA ライブラリーを合成する工程、
 - b) (1)、(12)、および (13) のいずれかに記載のセンス鎖 cDNA ライブラリーをドライバーとし、テスター cDNA をハイブリダイズさせる工程、および
 - c) 工程 b) においてハイブリダイズしなかった cDNA またはハイブリダイズした cDNA を選択する工程

本発明によれば、5'側において固定されたセンス鎖 cDNA が提供される。固定化された cDNA は 1 本鎖・2 本鎖、いずれの形態であってもよい。また、2 本鎖とする場合に、その全長が 2 本鎖である場合のみならず、部分的な 2 本鎖構造となってもよい。いずれにせよ、相補鎖合成反応によって 2 本鎖を再構成できるものであれば特に限定されない。

本発明において、センス鎖とは遺伝情報を保持している配列を意味する。具体的には、mRNA の塩基配列がセンス鎖である。これに対してアンチセンス鎖とは、センス鎖の相補的な塩基配列を意味する。したがって mRNA を鋳型として合成された第 1 鎖 cDNA は、アンチセンス配列を持つことになる。本発明の cDNA ライブラリーとは、その配列が未知である mRNA を鋳型として合成された DNA

(すなわち cDNA) の集合体である。なお本発明において、配列が未知とは、単に個々の RNA の配列が特定されていないことを意味する。したがって、未知とは言え実際には既知のものと未知のものとが混在することになる。一方本発明において単に cDNA と表記する場合、ある特定の mRNA を鋳型として得られた cDNA を意味する。更に 5'側の固定とは、センス鎖 cDNA の 5'末端のみならず、5'近傍での固定をも含むものである。

望ましい態様においては、cDNA ライブラリーには mRNA のポピュレーションをできるだけ忠実に反映することが求められるが、目的によっては偏りを持ったものであってもかまわない。あるいは、意図的に偏った状態のライブラリーが求められる場合もある。

また本発明において、第 1 鎖 cDNA の 3'末端に付加される人為的に付加した既知の塩基配列とは、相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドとのハイブリダイズを可能とするものであれば、任意の配列であってよい。いずれにせよ、前記人為的に付加した既知の塩基配列部分からプライムして cDNA のセンス鎖が合成される。このとき、プライマーの 5'末端を固相に固定しておくことによって、合成される第 2 鎖 cDNA は固定化されたものとなる。固相にオリゴヌクレオチドを固定する方法は、いくつかの化学的な方法が公知である。

本発明の望ましい態様にあつては、前記人為的に付加した既知の塩基配列として、RNA ポリメラーゼによって認識されるプロモーターや任意のタンパク質のアンチセンス配列といった機能的な遺伝子配列を選択することができる。これらの配列を利用した場合、最終的に合成されるセンス鎖 cDNA ライブラリーは、センス鎖 cDNA の上流にこれらの機能的な配列を配置した構造となる。しかも本発明においては、センス鎖 5'側を固定化したことによって、完全長 cDNA の構成比率を大きくすることができるうえ、センス鎖 cDNA の上流に配置する配列が比較的長い場合でも、容易に目的とする構造の cDNA ライブラリーを作成することが可能となる。その結果、この cDNA ライブラリーをもとに転写される RNA は、ソ

ースとなった mRNA における 5'側の翻訳開始点を含む領域が高い確率で再構成される。翻訳開始点を含んだ RNA は、タンパク質への翻訳が可能である。このような構造を持った cDNA ライブラリーは新規であり、したがってこの構造によってもたらされるいくつかの応用技術も新規なものである。本発明によって得ることができるいくつかの特徴的な構造と、この構造によって達成される新たな cDNA ライブラリーの応用技術については、後に更に具体的に述べる。

本発明はまた、前記 5'側において固定されたセンス鎖 cDNA の合成方法を提供する。本発明に基づく cDNA の合成方法の望ましい態様においては、完全長 cDNA を多く含む新規な固定化 cDNA ライブラリーを提供することができる。このような本発明による固定化 cDNA ライブラリーの合成方法についても、以下により具体的に記載する。

本発明の cDNA は、センス鎖の 5'末端が固相に固定されている。このような構造の cDNA は、第 1 鎖 cDNA の 3'末端に人為的に付加した既知の塩基配列を付加する一方、前記人為的に付加した既知の塩基配列に相補的な配列を持つプライマーによって、第 1 鎖 cDNA を鋳型に第 2 鎖（すなわちセンス鎖）合成するとき、前記プライマーを固定化しておくことによって得ることができる。プライマーの固定は、たとえば予め適当な固相に固定化しておくことによって達成される。固定化用の担体には、マイクロタイタープレート、プラスチックチューブ、あるいはマイクロビーズ等が用途に応じて利用できる。反応面積が広いこと、磁性キャリアとすることで磁石を使った分離が行えること等のメリットが期待できる微粒子状の担体は特に望ましい素材である。固相へのオリゴヌクレオチドの固定方法としては、たとえばクロスリンカーを使ってオリゴヌクレオチドの 5'末端をプレートに共有結合させる方法（米国特許 5656462）等が公知である。あるいは、5'末端や末端に近い塩基にビオチンのような結合親和性を持つ分子を導入しておけば、これを固相化したアビジンに結合させることによって、末端部分のみならず 5'末端近傍での固定が可能である。プライマーとして機能することができるかぎ

り、結合親和性分子の導入位置は制限されない。

本発明において、cDNAの出発材料となる mRNA を不特定多数の mRNA (すなわち mRNA ライブラリー) とすれば、cDNA ライブラリーを得ることができる。mRNA ライブラリーは、培養細胞や組織等を材料として公知の方法によって得ることができる。すなわち、グアニジンチオシアネート-塩化セシウム法(Molecular Cloning 2nd Ed., p.7.10, 1989)や、グアニジンチオシアネート-トリフルオロ酢酸セシウム法(H.Okayama et.al., Methods in Enzymology.Vol.154, p.3, 1987)等の方法が公知である。これらの方法に必要な試薬類をセットにしたキット (RNA Extraction Kit; Pharmacia 製、商品名) も商業的に供給されている。本発明の cDNA は、真核生物の mRNA のみならず原核生物の mRNA や、RNA ウイルスのゲノムを鋳型とすることができる。ただしこれらの RNA は真核生物とは異なりポリ(A)構造を持たない場合がある。したがって、第1鎖の合成にはランダムプライマー等を利用する必要がある。

他方、本発明において、第1鎖 cDNA の3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する方法としては、たとえば、第1鎖 cDNA 合成後、第1鎖 cDNA の3'末端に直接、人為的な既知の塩基配列を付加する方法、あるいは、あらかじめ mRNA の5'末端に前記既知の塩基配列に対する相補配列を付加しておき、これを鋳型としてその3'末端に既知の塩基配列を有する第1鎖 cDNA を合成する方法などが可能である。以下に、本発明によるセンス鎖 cDNA の合成に利用することができる各方法について具体的に説明する。合成ステップに応じて、次のような順に説明を行う。

- 1 : 第1鎖 cDNA の3'末端への人為的な塩基配列の付加
- 2 : 人為的な塩基配列を完全長 mRNA 特異的に導入するためのバリエーション
- 3 : 第1鎖 cDNA (アンチセンス鎖) の合成
- 4 : 第2鎖 cDNA (センス鎖) の合成

[第1鎖 cDNA の 3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する方法]

第1鎖 cDNA の 3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する方法としては、たとえば、第1鎖 cDNA 合成後、第1鎖 cDNA の 3'末端に直接、人為的な既知の塩基配列を付加する（図2）ことが可能である。まず、5'末端にリン酸基を有し、かつ 3'末端側でライゲーションが起こらないように構造的にブロックした、任意の配列（付加すべき塩基配列）を有するオリゴヌクレオチドを合成する。任意の塩基配列からなるオリゴヌクレオチドを化学的に合成する方法は公知である。一方第1鎖 cDNA を、5'末端がリン酸化されていないオリゴ dT プライマーもしくはオリゴ dT アダプターをプライマーとして合成する。両者をライゲーション反応させると、合成オリゴヌクレオチドの 5'末端リン酸基と第1鎖 cDNA の 3'末端水酸基の間で特異的にライゲーションが起こり、前記合成オリゴヌクレオチドが第1鎖 cDNA の 3'末端に結合する。前記合成オリゴヌクレオチドの配列は既知なので、最終的に第1鎖 cDNA の 3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加したことになる。

前記合成オリゴヌクレオチドの 3'末端側をブロックする方法としては、たとえば、3'末端の残基をジデオキシヌクレオチドにしておく方法がある。あるいは、3'末端の水酸基をアミド基などに修飾しておいても良い。

第1鎖 cDNA を合成後に修飾する方法に対して、鋳型となる mRNA を修飾する方法を採用することもできる。すなわち、付加すべき人為的な既知の塩基配列の相補配列を、あらかじめ mRNA の 5'末端に付加しておく。この mRNA を鋳型として第1鎖 cDNA を合成すれば、その 3'末端には mRNA の 5'末端に付加した配列の相補配列（すなわち人為的な既知の塩基配列）が付加されることになる（図3）。mRNA の 5'末端に人為的な既知の塩基配列を付加するには、たとえば、合成オリゴヌクレオチドを、RNA リガーゼを用いて mRNA 分子の 5'リン酸基末端に付加する方法を利用することができる。合成オリゴヌクレオチドとしては、合成オリゴ RNA、合成オリゴ DNA-RNA ハイブリッド、合成オリゴ DNA 等を示

することができる。第2鎖合成に先立って RNA を分解除去する必要があるれば、いっしょに除去できるように合成オリゴヌクレオチドも RNA としておくのが有利である。mRNA の 5'末端が水酸基となっている場合には、リン酸基に変換することによってより効率的に合成オリゴヌクレオチドを付加することが可能である。リン酸化は、たとえば T4 ヌクレオチドキナーゼ処理によって達成できる。

[完全長 cDNA (第1鎖) の 5'末端に選択的に人為的な既知の塩基配列を付加する方法]

最初に具体例として示したいいくつかのバリエーションでは、いずれも全ての mRNA を対象として人為的な塩基配列を付加していた。これに対して、完全長 mRNA のみを対象として人為的な塩基配列の付加を行う方法を採用することもできる。mRNA 源が真核生物の場合、完全な mRNA の 5'末端には CAP 構造と呼ばれる特異的な構造が存在する。この CAP 構造に対して選択的に合成オリゴヌクレオチドを付加すれば、最終的には高い頻度で翻訳開始コドンを含む cDNA のライブラリーを作成することが可能となることが知られている。この原理を本発明に応用し、完全長 cDNA をより高い割合で含む cDNA ライブラリーとすることができる。すなわち、前記人為的な既知の塩基配列に対して相補的な配列を持ったオリゴヌクレオチドを用い、これを CAP 構造部分特異的に付加するのである (図4)。

CAP 構造に対して選択的にオリゴヌクレオチドを付加する方法としては、アルカリ性ホスファターゼ処理を施した mRNA をタバコ酸性ホスファターゼ処理した後に RNA リガーゼを用いて合成オリゴヌクレオチドを付加するオリゴ CAP 法 (Maruyama, S. and Sugano S. Oligo-capping: A simple method to replace the CAP structure of eucaryotic mRNAs with oligonucleotides. Gene 138 (1994): 171-174,) が公知である。また、合成 RNA に代えて合成 DNA-RNA ハイブリッドを用いた改良オリゴ CAP 法 (S. Kato et al., Gene, 150, 243-250 (1994).、加藤・

関根 特開平 6-153953 号公報 1994 年 6 月 3 日)、CAP 構造に特徴的なジオールを酸化的に開裂してアルデヒド基に変換した後、3'末端にアミド基を付加した合成オリゴヌクレオチドと化学的に結合させるリンカー化学結合法(N. Merenkova and D. M. Edwards, WO 96/34981 Nov. 7, 1996.)等が知られている。これらの方法によれば、mRNA の 5'側末端に存在する CAP 構造を特異的に人為的なオリゴヌクレオチドに置換することができる。こうして得られた mRNA を鋳型とすれば、第 1 鎖合成用プライマーで合成された第 1 鎖 cDNA のうち、完全長のもののみがその 3'側に人為的に付加した既知の塩基配列を持つことになる。

[第 1 鎖 cDNA (アンチセンス鎖)]

本発明における第 1 鎖 cDNA の合成は、公知の方法によって実施することができる。ただし、その 5'側に人為的な塩基配列を付加する方法の態様の違いによって、そのタイミングが異なるのは既に述べたとおりである。すなわち、第 1 鎖合成前に mRNA の段階で人為的な塩基配列を付加するのか、あるいは従来どおり第 1 鎖 cDNA 合成を行った後に人為的な塩基配列を付加するのか、という相違である。本発明に適用することができる第 1 鎖の合成方法について、具体的に述べる。第 1 鎖の合成のバリエーションは、プライマーの選定に依存する。真核細胞由来の mRNA の全てを第 1 鎖として合成するときには、オリゴ dT プライマーを利用する。ポリ(A)構造を持たない原核細胞生物やウイルスの RNA を材料とする場合には、ランダムプライマー等の利用を考慮すべきである。

一般的な cDNA ライブラリーは mRNA のポピュレーションを反映すること、あるいは発現している遺伝子を忠実に回収することが求められる。しかし、場合により目的とする遺伝子を積極的に絞り込む操作が意図的に加えられることもある。たとえば、サブトラクションによって特定の細胞集団に特異的に発現している遺伝子のライブラリーを調製するケースが考えられる。この他にも、たとえば 3'側の配列のみが判明している遺伝子の単離を目的として、この判明している部

分の配列をプライマーとして第1鎖を合成すれば、3'側の構造が類似した候補遺伝子のみで構成されたライブラリーとすることができる。あるいはまた、イムノグロブリンの可変部をコードする遺伝子では、比較的保存性の高い3'側の構造をもとに第1鎖を合成することにより、可変部遺伝子のライブラリーを得ることができる。なおこれら第1鎖合成用のプライマーは、標的 mRNA の塩基配列に対して完全に相補的である必要はない。与えられたストリンジェンシーの元で相補鎖にアニールすることができ、少なくともその3'末端が完全に相補的であれば相補鎖合成は開始できる。

以上のような第1鎖合成用プライマーは、化学的に合成することができる。得られたプライマーを mRNA にアニールさせ、dNTP 共存下で逆転写酵素を作用させれば、mRNA を鋳型として第1鎖が合成される。得られた第1鎖は、前記の人為的な塩基配列を付加するための方法のバリエーションにしたがい、様々な方法によって第2鎖合成のための鋳型として利用される。

第2鎖 cDNA の合成

本発明においては、第1鎖 cDNA に対して人為的に付加した既知の塩基配列の相補配列（センス配列）をプライマーとして第2鎖の合成を行うことができる。このとき、第2鎖合成用プライマーをその5'側で固定しておけば、第2鎖 cDNA（センス鎖）の5'末端が固定化される。

先に述べた完全長 cDNA 特異的に人為的な配列を付加する態様においては、完全長 cDNA が持つ3'側の人為的に付加した既知の塩基配列部分が特異的にアニールし、結果として理論的には完全長 cDNA が特異的に固定化されることになる。本発明においては、合成された第2鎖（センス鎖 cDNA）は、固相に固定されているので遊離する恐れは低いし、たとえ相補鎖を失うことがあってもオリゴ dT プライマーを使って容易に2本鎖を再構成できる。こうして得られた第2鎖（センス鎖）のライブラリーは、高い頻度で翻訳開始コドンを含む完全長2本鎖 c

DNA ライブラリーとすることができる。なおこのような方法に基づけば理論上は完全長 cDNA のみで構成された cDNA ライブラリーを構成できることになる。しかし現実には、あるていどの不完全長 cDNA が混在する可能性を否定できない。すなわち本発明における完全長 cDNA ライブラリーとは、必ずしも完全長 cDNA のみで構成される必要は無く、cDNA の構成比率が高いものをも含むものである。cDNA ライブラリーに占める完全長 cDNA のライブラリーの割合を定量的に把握するには、たとえば cDNA の塩基配列を解析して翻訳開始コドンを含む確率を推計するプログラムを利用することができる。この種のプログラムとしては、Gene Finder (Solovyev V.V., Salamov A.A., Lawrence C.B. Predicting internal exons by oligonucleotide composition and discriminant analysis of spliceable open reading frames. Nucleic Acids Res.(1994) 22: 5156-63.) が公知である。あるいは本出願人による特願平 9-289982 は、翻訳開始コドンの予測をより的確に実施する方法を開示している。

一般的には、完全長 cDNA を与えるのは理想的な条件の元であっても全 mRNA のうちの一部と推測されている。不完全な長さの cDNA が混在することは、常に不利益につながるわけではない。しかし、たとえば PCR のような核酸合成反応では短い配列が優先的に合成される傾向がある。合成された短い配列は、完全長 cDNA の単離等を妨げる原因になりかねないので、不完全な長さを持った cDNA の割合を低く押さえるのが良質な cDNA ライブラリーの条件といえる。

以上のようにして本発明による cDNA を合成することができる。公知の固定化オリゴ dT 法によって、第 1 鎖（アンチセンス鎖）の 5'側を固定した固定化ライブラリーとすることもできる。しかし、こうして固定化される cDNA ライブラリーには、本発明の cDNA ライブラリーとは異なり、不完全な長さを持ったものが多く含まれたものとなる。続いて、センス鎖の 5'側に付加する人為的な塩基配列について述べる。

[人為的に付加する既知の塩基配列のバリエーション]

本発明において固定化されるセンス鎖 cDNA の 5' 末端の上流に人為的に付加する配列としては、任意の塩基配列を採用することができる。基本的な態様においては、第 2 鎖（センス鎖）合成用のプライマーとアニールすることが可能な塩基配列であれば良い。更に単なるプライマーとのアニールのみならず、この塩基配列に機能的な配列を用いた場合には、その機能に基づいて本発明による cDNA ライブラリーをさまざまな形で応用することができる。以下に人為的な既知の塩基配列のバリエーションと、その応用について具体的に述べる。

なお、塩基配列を人為的に付加するのにあたり、付加方法にはいくつかの態様を示すことができる。たとえば、それはアンチセンス鎖の 3' 末端に付加した配列として与えられる。この配列にアニールしてセンス鎖合成用のプライマーとなる配列が、すなわちセンス鎖 5' 末端上流に人為的に付加する配列となる。このプライマーには、更にその上流に伸びる領域を与えることができる。この領域は第 1 鎖にアニールする領域よりも上流に伸びているので第 1 鎖とのアニールはしないが、第 2 鎖の 5' 側を構成することになる。この場合、アンチセンス鎖の 3' 末端部分はプライマーの一部に対してアニールする形をとるが、プライマーの 3' 側がアンチセンス鎖にアニールすることには変わりはないので相補鎖合成は進行する。この上流に突出した配列については 1 本鎖状態のままであることもできる。あるいは、機能的な塩基配列が 2 本鎖とならなければ機能できないとき（たとえば図 6 におけるプロモーター配列のように）には、この状態で第 1 鎖（アンチセンス鎖）側の相補鎖合成を更に進めることにより、付加すべき機能的な配列に相補的な塩基配列が合成されて 2 本鎖を完成することができる（後述）。これらの態様によれば、長い塩基配列であっても容易に付加することができる。なおここで述べた、第 1 鎖とのアニールのための領域、あるいは上流に伸びる領域といった特定の領域は、あくまでも説明のためのものである。したがって、現実には機能的な塩基配列の一部が第 1 鎖とのアニールのための領域としても機能し、残りの部分

がその上流に位置するといった構成となる。

人為的に付加する既知の塩基配列として有用な第一のバリエーションは、RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターである (図5)。その他、任意のタンパク質をコードするセンス鎖の配置によって融合タンパク質をコードする cDNA ライブラリーの構成も可能である。まず、プロモーターとの組み合わせについて説明する。

本発明における人為的に付加した既知の塩基配列として RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターを用いた場合、プロモーターをセンス鎖 cDNA の上流に配置することができる。このプロモーターが、インビトロでの RNA 合成を可能にする RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーター配列であれば、RNA ポリメラーゼにより cDNA を鋳型とした RNA の転写が行われる。このような応用を可能とするプロモーターには、T7 プロモーター配列 (Pribrnow, D., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.72/3:784-788,1975)、T3 プロモーター配列 (Adhya, S., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.78/1:147-151,1981)、および SP6 プロモーター配列 (Brown, J.E., Nucleic Acids Res.14/8:3521-3526,1986) を示すことができる。これらのプロモーターは、必ずしも全配列が必要なわけではなく、プロモーター活性の維持に必要なドメインのみを利用すれば良い。各プロモーターの必須配列 (センス鎖) を以下に示す。この塩基配列はセンス鎖のものであるので、第 1 鎖 cDNA (アンチセンス鎖) の 3' 末端に付加するには、下記配列に対するアンチセンス配列となるようにする。

T7:TAATACGACTCACTATAGGG (配列番号: 1)

T3:AATTAACCCTCACTAAAGGG (配列番号: 2)

SP6:ATTTAGGTGACACTATAG (配列番号: 3)

本発明に基づいてインビトロで RNA の転写を行うためには、以下のような操作を行う。すなわち、プロモーターを上流に配置した本発明による cDNA に、RNA の合成に必要なリボヌクレオチド (rNTP) を加え、用いたプロモーターを認識する

RNA ポリメラーゼを作用させるのである。反応液にはリボヌクレアーゼの混入を避け、更に望ましくはリボヌクレアーゼ阻害剤を添加しておくが良い。30分から数時間反応させれば、 μg オーダーの RNA を転写させることができる。転写終了後に固相を分離すれば、鋳型とした cDNA は簡単に分離することができる。また分離した cDNA が洗浄後に簡単に再利用できることも本発明の大きな特徴である。他方、転写された RNA は、フェノールクロロホルムで抽出しエタノール沈殿させることによって酵素や未反応の基質 rNTP から分離・回収される。鋳型とした cDNA がライブラリーであれば、mRNA をライブラリーとして得ることが可能である。

このとき、本発明による cDNA ライブラリーをそのまま鋳型に用いても良いが、二次的な cDNA ライブラリーを鋳型とすることもできる。すなわち、本発明による cDNA ライブラリーをプライマリーライブラリーとして PCR 増幅したセカンダリーライブラリーを鋳型として利用するのである。なおプライマリーライブラリーとは、2 次的なライブラリー（すなわちセカンダリーライブラリー）を合成するときその鋳型として機能するライブラリーを表す用語である。プライマリーライブラリーは、もとの mRNA のポピュレーションを比較的忠実に反映している反面、1 種類の mRNA 当たりの cDNA が少ない可能性がある。つまり、RNA 合成のための鋳型の数が少ないのである。RNA ポリメラーゼの転写能力には限りがあるので、鋳型を多くすることによってより多量の転写生成物が期待できるようになる。セカンダリーライブラリーを得るには、本発明の cDNA ライブラリーに対して、オリゴ dT プライマーと、第 1 鎖に付加した人為的な既知の塩基配列に相補的な配列を持つプライマーとで PCR を行う。このときプライマーのいずれかを固定化しておけば、セカンダリーライブラリーも固定化した状態で得ることができる。更にセカンダリーライブラリー合成用のプライマーを固定する担体がプライマリーライブラリーが固定された担体と分離可能なものであれば、合成されたセカンダリーライブラリーを容易に分離することができる。たとえばプラ

イマリーライブラリーを容器内壁に固定した場合、セカンダリーライブラリーを粒子状の担体に固定すれば両者の分離は容易である。

センス鎖 5'側で固定化することによって得ることができる本発明による cDNA ライブラリーは、鋳型の段階で完全長 cDNA の割合が高い。したがって、ライブラリーとしての一定の多様性を保った状態の 2 次的なライブラリーを再現性良く得るためのプライマリーライブラリーとして利用する場合にも有用である。本発明においては、このように完全長 cDNA の割合を維持した状態で 2 次的なライブラリーを与えうるプライマリーライブラリーを特にマスターライブラリーと呼ぶ。

なお本発明においては、センス鎖 cDNA の上流にプロモーターを配置できるので、転写される RNA はセンス鎖 RNA (すなわち mRNA と同じ配列) となる。したがって、こうして転写された RNA が翻訳開始点を含んでいれば、適当な発現システムに適用することにより、そのままタンパク質の発現が行われる。本発明における発現システムとは、前記 RNA に基づいてタンパク質への翻訳を行うことができる系を意味する。それはインビトロであってもインビボであっても良い。本発明に基づく cDNA では、大きく分けて 2 種類の翻訳開始点が存在する可能性がある。1 つは鋳型となった mRNA に由来するものであり、いまひとつは人為的に付加した塩基配列が提供する翻訳開始点である。翻訳開始点が mRNA に由来する場合には、その cDNA は完全長 cDNA である可能性が非常に高い。一方、翻訳開始点が人為的に付加した塩基配列によって与えられるケースについては、後に本発明による cDNA を融合タンパク質として発現させる態様として詳細に述べる。いずれにせよ、翻訳開始点を含む場合には、cDNA から転写された RNA をもとにタンパク質への翻訳が可能である。cDNA がライブラリーであれば、それを元にして得られるタンパク質もライブラリーを構成する。本発明は、こうして得ることができるタンパク質ライブラリーをも提供するものである。

cDNA ライブラリーを元に得られたタンパク質は、cDNA ライブラリーの状態を反映したタンパク質ライブラリーとなる。インビトロで転写された RNA を

もとにタンパク質に翻訳が可能な発現システムとしては、ウサギの網状赤血球を溶血させたものや、コムギ胚抽出液などを利用した発現用のキットが市販されているので、これを利用すれば良い。これらの無細胞発現系によれば、タンパク量としては微量ながら、タンパク質を溶解した形で、しかも天然の構造に近い状態で得ることができる。得られたタンパク質ライブラリーは、薬剤標的のスクリーニング源として、あるいは発現しているタンパク質の変化から細胞状態を調べるための解析材料として利用することができる。

本発明の cDNA ライブラリーから転写されたセンス鎖 RNA ライブラリーは、細胞内で直接発現させることもできる。センス鎖 RNA を細胞に導入すれば、細胞内でそのセンス鎖 RNA がコードしている遺伝子の生物活性を発現させることが可能である(Henle,K.J.et al.Expression of thermotolerance following microinjection of poly(A)RNA isolated from thermotolerant CHO cells. Int.J.Hyperthermia.6(6):1041-1051,1990)。細胞に RNA を導入する手段としては、一般的にはマイクロインジェクションが適当であるが、リポフェクション、パーティクルガンといった核酸分子を細胞内に導入することを可能にする方法であれば、いずれの方法でも利用することができる。細胞に導入されたセンス鎖 RNA を鋳型に、細胞内のタンパク質合成系が働いて導入した遺伝子がコードするタンパク質を生産し、それらの生物活性を発現する。

たとえば発生における一過的な段階における細胞、あるいは限られた病態組織などを材料に、その生理状態が細胞に与える影響を調べる実験系や、そうした生理状態において作用する薬物などをスクリーニングするためのアッセイ系などを構築しようとする場合、その材料には量的な限りがある。そのため再現性良く、また大量に調製することは非常に困難となる。このような場合において、対応する生理状態の細胞や組織から、本発明に基づいて合成した cDNA ライブラリーが有用である。すなわち、これをマスターライブラリーとして得られる RNA ライブラリーを適当な細胞系に導入することにより、目的とする細胞の状態を擬似的

をドライバーとして cDNA のサブトラクション法が可能となる。つまり、任意の方法によって合成した第 1 鎖 cDNA をテスターとして本発明による cDNA ライブラリーにハイブリダイズさせれば、第 1 鎖 cDNA にのみ含まれている配列を持った cDNA はハイブリダイズできないで液相に残る。これを固相から分離することによって、サブトラクションを容易に行うことができる。本発明の cDNA ライブラリーをコントロールとして用いれば、いろいろな対象に対してサブトラクションを繰り返し実施することができ、再現性の高い研究を行うことができる。具体的には、たとえば正常細胞に由来する cDNA ライブラリーを本発明に基づいて固相化しておく。この cDNA ライブラリーを用いて、薬剤候補化合物で処理した細胞の cDNA をサブトラクションすれば、薬剤候補化合物のスクリーニングを行うことができる。あるいは、癌細胞のような異常細胞の cDNA のサブトラクションを行えば、異常細胞に特異的な遺伝子を選択することもできる。また、肝細胞に由来する cDNA ライブラリーを固定化して、その他の臓器に由来する cDNA をサブトラクトすることにより、臓器特異的な遺伝子の選択が可能である。いずれのケースにおいても、本発明による cDNA ライブラリーは、センス鎖を固定しているので、第 1 鎖 cDNA のサブトラクションを可能とする点で、公知のサブトラクション法にはない作業効率を達成できる。しかも、望ましい態様においては完全長 cDNA の多様性を高度に維持していることから、より確実なサブトラクションを期待できる。また、固相化されていることから繰り返し利用できるという利点がある。

本発明の cDNA ライブラリーは、これをソースとして遺伝子のクローニングを進めることもできる。たとえば、本発明の cDNA ライブラリーをもとにインビトロで mRNA ライブラリーを合成し、これを通常の遺伝子クローニング方法によってスクリーニングすることができる。このようなスクリーニング方法を実施するためのライブラリーを商業的に供給する場合には、次のような態様が考えられる。

- ・ 本発明の cDNA ライブラリーに基づいて合成した mRNA ライブラリー
- ・ その mRNA から合成した cDNA ライブラリー
- ・ 本発明の cDNA ライブラリーに基づいて合成した DNA ライブラリー

あるいは、得べき遺伝子の構造が既に判明している場合には、本発明の cDNA ライブラリーから直接 PCR により増幅する、あるいは本発明の cDNA ライブラリーから合成された mRNA を鋳型として RT-PCR を行うといったような方法によって目的の遺伝子を得ることができる。

いずれにせよ、繰り返し述べているように、このような様々な態様が可能となるのは、本発明の cDNA ライブラリーが効率良く完全長 cDNA を固定化できることから、完全長 cDNA の多様性に富んだ 1 次的なライブラリーを作成できるためにほかならない。公知の方法では完全長 cDNA の多様性が高い固定化 cDNA ライブラリーを作成することが困難であり、これをマスターライブラリーとして 2 次的、あるいは 3 次的なライブラリーを合成すると完全長 cDNA の多様性が著しく低下してしまい、遺伝資源として必要な品質を維持できないのである。これに対して本発明においては、試料に由来する完全長 mRNA と同等の cDNA (あるいは mRNA) ライブラリーを原理的には無限に合成することができる。つまり本発明による cDNA ライブラリーは、クローニング用のマスターライブラリーとして望ましい特徴を備えたものであるということができる。

以下に、本発明に基づいてセンス鎖の 5'側を固定した cDNA ライブラリーを構築し、これをプライマリーライブラリーとして 2 次的なライブラリーや mRNA ライブラリーを調製する操作について、具体的な操作を例示する。この例においては、mRNA の 5'側に人為的な配列を付加する方法として、オリゴ CAP 法を応用したが、本発明はこの具体例に限定されるものではない。なおオリゴ CAP 法の基本的な操作については、鈴木穰・菅野純夫(1996)「cDNA クローニング」(羊土社) pp46-51 に記載された方法に準じる。

細胞試料から抽出した 5 μ g(84 μ L)のポリ(A)⁺RNA に、以下の試薬を加え、

37°Cで 30 分間インキュベートする。反応液をフェノールクロロホルム処理 (2 回) し、RNA をエタノール沈でんにより回収する。

10 μ L の 10×BAP 緩衝液 (寶酒造製)

3 μ L のアルカリフォスファターゼ (細菌由来、寶酒造製)、および

3 μ L のリボヌクレアーゼインヒビター

回収した沈でんを 75 μ L の蒸留水に溶解し、これに以下の試薬を加え、37°Cで 30 分間インキュベートする。反応液をフェノールクロロホルム処理し、RNA をエタノール沈でんにより回収する。

20 μ L の 5×TAP 緩衝液、

3 μ L のタバコ酸性ピロフォスファターゼ (Shinshi, H. et al. Biochem. 15, 2185, 1976)、および

2 μ L のリボヌクレアーゼインヒビター (寶酒造製)

*5×TAP 緩衝液:

250mM 酢酸ナトリウム (pH5.5)

5mM EDTA (pH8.0)

50mM 2-メルカプトエタノール

回収した沈でんを 6.4 μ L の蒸留水に溶解し、これに以下の試薬を加え、16°Cで 3 時間インキュベートする。反応液をフェノールクロロホルム処理し、RNA をエタノール沈でんにより回収する。ここで添加するオリゴ RNA が、付加すべき人為的な塩基配列を持つオリゴヌクレオチドである。その塩基配列は、たとえば 5'末端近傍に SfiI 切断配列を有し、全体としてストリンジェントな条件下で相補鎖とのアニールが可能な鎖長を持った合成オリゴ RNA とする。

10 μ L の 10×RNA Ligation Buffer (寶酒造製)、

20 μ L の 25mM $MgCl_2$ 、

2.1 μ L の 24mM ATP、

4 μ L のオリゴ RNA (100ng/ μ L)、

50 μ L の 50% ポリエチレングリコール 8000、
5 μ L の T4RNA リガーゼ（寶酒造製）、および
2.5 μ L の リボヌクレアーゼインヒビター（寶酒造製）

回収した沈でんを 50 μ L の TE 緩衝液に溶解し、スパンカラム(Pharmacia Size Sep 400)で未反応のオリゴ RNA を除く。得られた RNA 分画をエタノール沈でんで回収する。ここまでの操作によって、完全長 mRNA の 5'側特異的に人為的な配列が付加される。次いで、この人為的な配列を付加した mRNA を鋳型として第 1 鎖 cDNA を合成する。回収した RNA を 21 μ L の蒸留水に溶解し、これに以下の試薬を加え、16°C で 1 時間、次いで 42°C で 1 時間インキュベートする。このとき用いるオリゴ dT アダプターは、その 5'末端に SfiI 認識配列を持つものとする。

10 μ L の 5 \times First Strand Buffer(Gibco BRL)、
6 μ L の 0.1M DTT、
8 μ L の 5mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP 混合溶液、
2 μ L のオリゴ dT アダプター(5pmol/ μ L)、
2 μ L の Superscript II(Gibco BRL)、および
1 μ L の リボヌクレアーゼインヒビター（寶酒造製）

反応液に更に 50 μ L の蒸留水を加え、フェノールクロロホルム処理し、2 μ L の 0.5M EDTA と 15 μ L の 0.1N NaOH を加え、更に 65°C で 1 時間インキュベートする。反応後の反応液に 20 μ L の 1M Tris-HCl(pH7.8)を加え、スパンカラム(Pharmacia Size Sep 400)により、第 1 鎖 cDNA を精製する。cDNA をエタノール沈でんにより回収し、80 μ L の蒸留水に溶解する。ここで回収される第 1 鎖 cDNA は、その 3'側に mRNA に対して付加した人為的な塩基配列に相補的な塩基配列を備えている。この第 1 鎖 cDNA を鋳型として、本発明による固定化 cDNA ライブラリーの合成を行う。

第 1 鎖 cDNA の 3'末端に付加された配列に相補的なオリゴ DNA を固定化した

チューブ(GenePlates, AGCT Inc.) に、第1鎖 cDNA(80 μ L)を移す。65°Cで10分間、続いて12°Cで30分間インキュベートして固定化オリゴ DNA とアニールさせた後、以下の試薬を加え、30°Cで30分間インキュベートする。

10 μ L の 5 \times T4 ポリメラーゼ Buffer (寶酒造製)、

8 μ L の 5mM dATP、dTTP、dCTP、dGTP 混合溶液、および

2 μ L の T4 DNA ポリメラーゼ(寶酒造製)

反応後、上清を除き蒸留水で洗浄して50 μ LのTE緩衝液を加える。このチューブの内壁には、第2鎖 cDNA (センス鎖 cDNA) が、その5'側を固定された状態で結合しており、本発明による固定化 cDNA ライブラリーを構成している。次いで、この cDNA ライブラリーをプライマリーライブラリーとする二次的な cDNA ライブラリーの合成操作について記載する。

本発明による固定化 cDNA ライブラリーに以下の試薬を加え、95°Cで5分間、「95°Cで1分、58°Cで1分、72°Cで10分」を15サイクル、72°Cで10分間の条件でDNAを増幅した後、4°Cに冷却する。5'側プライマーにはチューブ内に固定したオリゴ DNA と同じ配列を、また3'側プライマーにはオリゴ dT プライマーを利用すれば良い。

52.4 μ L の蒸留水、

30 μ L の 3.3 \times PCR Buffer (Perkin-Elmer)、

8 μ L の 2.5mM dNTP 混合溶液、

4.4 μ L の 2.5mM 酢酸マグネシウム、

1.6 μ L の 5'-プライマー (10pmol/ μ L)、

1.6 μ L の 3'-プライマー (10pmol/ μ L)、および

2 μ L の GeneAmp DNA Polymerase (Perkin-Elmer)

上清を新しいチューブに移し、フェノールクロロホルム処理し、エタノール沈でんの後、沈でんを89 μ Lの蒸留水に溶解する。これに以下の試薬を加え、50°Cで3.5時間インキュベートする。

10 μ L の Buffer #2 (New England Biolabs)、

1 μ L のウシ血清アルブミン($\times 100$) (New England Biolabs)、および

2 μ L の SfiI (New England Biolabs)

反応液をフェノールクロロホルム処理し、エタノール沈でんの後、沈でんを 50 μ L の TE 緩衝液に溶解する。アガロースゲル電気泳動を行い、ゲルからの切り出しにより短い断片を除去し、回収した DNA を 20 μ L の蒸留水に溶解する。この DNA を DraIII で切断した pME18SFL3 ベクター (GenBank Accession Number: AB009864)断片の粘着末端—前記 SfiI で切断した DNA 断片に残る粘着末端に相補的—と T4 DNA リガーゼでライゲーションさせ、大腸菌に形質転換する。こうして、本発明の cDNA ライブラリーをプライマリーライブラリーとする二次的なベクターライブラリーを構築することができる。あるいはまた、前記人為的に付加する配列として、RNA ポリメラーゼのプロモーター配列を利用した場合には、インビトロ転写反応によってセンス鎖 RNA ライブラリーの合成が可能である。以下に RNA ライブラリーの合成について述べる。

本発明による固定化 1 次ライブラリーに以下の試薬を加え、37°C で 10 分間インキュベートする。反応後の上清を新しいチューブに移し、フェノールクロロホルム処理し、エタノール沈でんの後、沈でんを 50 μ L の蒸留水に溶解する。このとき回収されるのは、本発明の cDNA を鋳型として転写された RNA ライブラリーに他ならない。

76.8 μ L の蒸留水、

10 μ L の 10 \times T7 Pol. Buffer (寶酒造製)、

8 μ L の 5mM rATP、rUTP、rCTP、rGTP 混合溶液、

4.4 μ L の 2.5mM 酢酸マグネシウム、および

2 μ L の T7 RNA ポリメラーゼ (寶酒造製)

図面の簡単な説明

図1は、本発明によるセンス鎖の5'側を固定した cDNA の合成原理を示す模式図である。

図2は、本発明によるセンス鎖の5'側を固定した cDNA の合成原理を示す模式図である。第1鎖 cDNA の3'末端に人為的な既知の塩基配列を付加する態様を示す。

図3は、本発明によるセンス鎖の5'側を固定した cDNA の合成原理を示す模式図である。mRNA の5'末端に人為的な既知の塩基配列の相補配列を付加する態様を示す。

図4は、本発明によるセンス鎖の5'側を固定した cDNA の合成原理を示す模式図である。mRNA の5'末端の CAP 構造に人為的な既知の塩基配列の相補配列を付加する態様を示す。5'末端の CAP 構造特異的な反応を利用することにより、完全長 cDNA を特異的に固定化できることを示す。

図5は、本発明によるセンス鎖の5'側を固定した cDNA の合成原理を示す模式図である。既知の配列としてプロモーターを用いたとき、センス鎖の上流への配置が可能となることを示す。

図6は、本発明によるセンス鎖の5'側を固定した cDNA の合成原理を示す模式図である。長い塩基配列を付加する場合のバリエーションを示す。

図7は、全長 EF1 α 遺伝子の PCR 増幅断片の泳動写真である。

図8は、完全長 cDNA のセンス鎖の5'末端を固定化したジーンプレートから DNA ポリメラーゼ Klenow 断片を用いて二次的な cDNA ライブラリーが繰り返して複製・回収して得られることを確認した泳動写真である。

図9は、センス鎖の5'末端側を固定化した EF1 α の全長 cDNA 断片を鋳型として試験管内で合成したセンス鎖 RNA を、ノーザンブロットで検出した結果を示す写真である。

発明を実施するための最良の形態

〔実施例 1〕 特定の全長 cDNA のセンス鎖の 5' 末端の固定化

特定の遺伝子のセンス鎖の 5' 末端を固定化する一例として、ヒト EF1 α (Elongation Factor-1 α , GenBank Acc.No.E02628) 全長 cDNA クローンのセンス鎖の固定化を行った。固定化する遺伝子断片には、鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」(羊土社) pp.46-51 に記載されたオリゴキャップ法で取得した第 1 鎖 cDNA ライブラリーを鋳型にして、PCR により増幅した EF1 α 全長 cDNA 断片を用いた。PCR プライマーには、EF1 α 遺伝子の 5' 末端に付加されているオリゴキャップリンカープライマー FL3-666 (配列 5'- AGC ATC GAG TCG GCC TTG TTG -3'; 配列番号: 4) と EF1 α cDNA (約 1.7Kb) の 3' 末端近傍の配列をもとに設計した EF1 α プライマー EF1-8R (配列 5'- TGG GTC TCA AAA TTC TGT GAC -3'; 配列番号: 5) を用いた。鋳型 DNA 溶液 0.5 μ l (約 10 ng) に 10 x PCR バッファー [100 mM トリス塩酸 (pH8.3)、500 mM 塩化カリウム、150 mM 塩化マグネシウム] 5.0 μ l、各 25 mM dNTP 4.0 μ l、5 pmol/ μ l のプライマー各 1.0 μ l ずつを加え、さらに滅菌水を加えて 49 μ l とし、Takara Taq DNA ポリメラーゼ (寶酒造) を 1.0 μ l (5.0 U) 加えて PCR を行った。PCR はパーキンエルマーモデル 9600 サーマルサイクラーを用い、95°C 5 分保温後、95°C 1 分、60°C 1 分、72°C 2 分の条件で 30 サイクル反応を行った。この PCR で、EF1 α 遺伝子のほぼ全長を含む 1750 塩基の断片が増幅された。PCR 後、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行った後、20 μ l の TE バッファーに溶解した。この全量を 1.0 % (w/w) アガロースゲル (1 x TAE バッファー) で電気泳動し、増幅した DNA 断片をジーンクリーン (バイオ 101) を用いて回収した。回収した断片は 20 μ l の TE バッファーに溶解した。

回収した EF1 α 全長 cDNA 断片溶液にプロテイナーゼ K (ベーリンガーマンハイム、終濃度 100 μ g/ml) とラウリル硫酸ナトリウム (SDS) (終濃度 0.5%) を加えて 37°C で 60 分間処理を行った。さらにこれをフェノールクロロホルム処

理、エタノール沈殿を行い、回収した DNA を 20 μ l の TE バッファーに溶解した。このようにして得た DNA を、T7-オリゴキャップリンカープライマオリゴ DNA (配列 5'- GTAATACGAC TCACTATAGG GAGCATCGAG TCGGCCTT GT TGGCCTACTG G-3'; 配列番号: 6) をスパーサーを介して固定化したジーンプレート[AGCT, Inc. 製 (Irvine, CA, USA)] のウェルに入れ、PCR によりセンス鎖の 5' 末端を固定化した。PCR にはジーンアンプ XL PCR キット (パーキンエルマー) を用い、全量で 50 μ l の系で反応を行った。EF1 α 全長 cDNA を含む DNA 断片の溶液 1 μ l (DNA 断片約 2 ng を含む) にそれぞれ 5 pmol/ μ l の FL3-666 プライマー (配列番号: 4) と EF1-8R プライマー (配列番号: 5) を各 1.0 μ l ずつ、各 2.5mM に調製した dNTP 溶液 4.0 μ l、3.3 x XL PCR バッファー (パーキンエルマー) 15 μ l、25 mM (CH₃COO)₂Mg 2.2 μ l、さらに水を加えて 49 μ l とし、rTth DNA ポリメラーゼ (パーキンエルマー) 1.0 μ l (2U) を加えて PCR を行った。反応はパーキンエルマーモデル 9600 サーマルサイクラーを用い、95°C 5 分保温後、95°C 1 分、60°C 1 分、72°C 2 分の温度条件で 25 サイクル行った。PCR 後、上清は回収して別の容器に移し、保存した。一方、このようにして EF1 α 全長 cDNA 断片を固定化したジーンプレートのウェルは、1 20 μ l のプレート洗浄バッファー[0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTA]で 2 回洗浄した。

[実施例 2] EF1 α 全長 cDNA のセンス鎖の 5' 末端を固定化したプレートからの 2 次増幅断片の取得

実施例 1 で作製した EF1 α 全長遺伝子断片を固定化したジーンプレートのウェルに、それぞれ 4 pmol の T7 プライマー (配列 5'-GTAATACGACTCACTATAGGG-3'; 配列番号: 7) と EF1-8R プライマー (配列番号: 5) を加えた Kle now 反応バッファー[終濃度として、各 0.2 mM の dNTP、10 mM トリス塩酸(pH7.5)、7 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM ジチオスレイトール] 39 μ l を入れ、

94°Cで30秒保温した。ウェル内の反応液の温度を30°Cまで冷却後、1 μ l (4U) のDNAポリメラーゼ Klenow 断片 (寶酒造) を加えて30°Cで3時間反応させた。反応後、上清を回収し、別の容器に移して保存した。cDNAを固定化したジーンプレートウェルは、120 μ lのプレート洗浄バッファー (0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTA) を用いて2回、軽いピペッティングで洗浄した。

EF1 α 全長 cDNA 断片を固定化したジーンプレートのウェルから回収した Klenow 反応液は、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、50 μ l のTEバッファーに溶解した。回収した Klenow 反応液 10 μ l に、それぞれ 5 p mol/ μ l の T7 プライマー (配列番号: 7) と EF1-8R プライマー (配列番号: 5) を各 0.5 μ l ずつ、各 2.5mM ずつの dNTP 溶液 2.0 μ l、3.3 x XL PCR バッファー (パーキンエルマー) 7.5 μ l、25 mM (CH₃COO)₂Mg 1.1 μ l、さらに滅菌水を加えて 24.5 μ l とし、rTth DNA ポリメラーゼ (パーキンエルマー) 0.5 μ l (1U) を加えて PCR を行った。PCR はパーキンエルマーモデル 9600 サーマルサイクラーを用い、95°C 5分保温後、95°C 1分、60°C 1分、72°C 2分の条件で30サイクル反応を行った。PCR 後、その 10 μ l を 1.0 % (w/w) アガロースゲル (1 x TAE バッファー) で電気泳動し、断片の増幅を確認した (図7)。この電気泳動で、ジーンプレートのウェルに固定化されていた EF1 α 全長 cDNA を鋳型として DNA ポリメラーゼ Klenow 断片の反応で複製、回収された 1.7kb の EF1 α の全長 cDNA 断片が確認された。各レーンに泳動したサンプルは以下に示した。EF1 α 全長 cDNA を含む DNA 断片 (1.7kb) のバンドの位置を右側に矢印で示した。

レーン1: ジーンプレートに固定化した EF1 α 全長 cDNA を含む DNA 断片。

レーン2: サイズマーカー

レーン3: ジーンプレートに固定化された EF1 α 全長 cDNA を鋳型に DNA ポリメラーゼ Klenow 断片を用いて複製、回収した二次増幅断片を、PCR で増幅したもの。

この電気泳動で、ジーンプレートの上セルに固定化されていた E F 1 α 全長 cDNA を鋳型として DNA ポリメラーゼ Klenow 断片の反応で複製、回収された 1.7 kb の E F 1 α の全長 cDNA 断片が確認された。

[実施例 3] 全長 cDNA ライブラリーのセンス鎖の 5'末端側での固定化

NT2 細胞から Sambrook の「モレキュラークローニング (第 2 版)」7.12 および 7.26 に記載された方法にしたがって取得した約 50 μ g のポリ(A)⁺ RNA から、鈴木穰、菅野純夫 (1996) 「cDNA クローニング」(羊土社) pp.46-51 に記載されたオリゴキャップ法によって、第 1 鎖 cDNA を作製した。第 1 鎖 cDNA にアニールしている mRNA はアルカリ処理によって除き、中和後、40 μ l の TE バッファーに溶解したものを用いた。この第 1 鎖 cDNA の固相への固定化は、DNA ポリメラーゼ Klenow 断片を用いて行った。

第 1 鎖 cDNA を含む溶液を 65°C で 5 分間保温して変性させた後、全量 50 μ l、終濃度で 0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTA となるように調製した。これを T7-オリゴキャップリンカープライマオリゴ DNA (配列番号: 6) がスパーサーを介して固定化されているジーンプレート (AGC T, Inc. 製) の上セルに入れ、16°C で 15 時間保温し、完全長 mRNA 由来の第 1 鎖 cDNA の 5'末端に連結されているオリゴキャップリンカーに相補的な cDNA 部分を、ジーンプレートに固定化されているオリゴキャップリンカーと同じ配列のオリゴ DNA と十分アニールさせた。その後、上清を取り除き、上セルを 120 μ l のプレート洗浄バッファー[0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTA]で 2 回洗浄した。この上セルに 39 μ l の Klenow 反応バッファー(終濃度として、各 0.2 mM の dNTP、10 mM トリス塩酸 (pH7.5)、7 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM ジチオスレイトール) と 1 μ l (4 U) の DNA ポリメラーゼ Klenow 断片 (寶酒造) を加えて、30°C で 3 時間反応させた。こうして、固定化されたオリゴ DNA にアニールした第 1 鎖 cDNA を鋳型に、5'末端が固定化

されたオリゴ DNA をプライマーとして第二鎖 cDNA を合成した。またこの時、固定化されているオリゴキャップリンカーの上流の T7 プロモーター配列に相補的な第 1 鎖 cDNA は、アニールした第 1 鎖 cDNA をプライマーとして同時に合成される (図 6 参照)。このようにしてセンス鎖の 5'末端がジーンプレートに固定化された完全長の二本鎖の cDNA ライブラリーを得た。第二鎖 cDNA の合成反応後、上清を取り除いた。取り除いた上清は別の容器に移して保存した。上清を取り除いた後、二本鎖 cDNA が固定化されているウェルは、洗浄バッファー (0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTA) を用いて 2 回洗浄した。

〔実施例 4〕センス鎖の 5'末端側を固定化した一次的な完全長 cDNA ライブラリーを鋳型とした二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーの繰り返し複製と単離

センス鎖の 5'末端を固定化した一次的な完全長 cDNA ライブラリーを鋳型として、二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーの合成が可能なことを確認した。一次的な完全長 cDNA ライブラリーとしては、実施例 3 でジーンプレートのウェルにセンス鎖の 5'側で固定化された cDNA ライブラリーを用いた。cDNA のセンス鎖側の 5'末端に連結されている T7 配列と 3'末端側に存在するポリ A 部分の配列をプライマーとし、DNA ポリメラーゼ Klenow 断片を用いた DNA 複製反応を行い、二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーを単離した。

ジーンプレートのウェルに、それぞれ 0.2 pmol の T7 プライマー (配列番号 : 7) と FL3-705 プライマー (配列 5'- GCG GCT GAA GAC GGC CTA TGT- 3'; 配列番号 : 8) 及び Klenow 反応バッファー[終濃度として、各 0.2 mM の dNTP、10 mM トリス塩酸 (pH7.5)、7 mM 塩化マグネシウム、0.1 mM ジチオスレイトール]を加えて 39 μ l とし、94°C で 30 秒保温した。ジーンプレートのウェル内の反応液の温度を 30°C まで冷却後、1 μ l (4 U) の Klenow 断片 (寶酒

造)を加えて 30°C で 3 時間反応させた。反応後、上清を回収し、固定化された cDNA を鋳型として複製された二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーを得た。使用したウエルは洗浄バッファー[0.5 M 塩化ナトリウム、10 mM トリス塩酸(pH8.0)、1 mM EDTA]を用いて 2 回洗浄した。この操作を繰り返すことにより、固定化されている一次的な完全長 cDNA ライブラリーを鋳型として複製した二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーを合成した。Klenow 反応液は各回の反応終了後とに回収し、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿を行った後、それぞれ 40 μ l の TE バッファーに溶解した。

このようにして得た二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーを鋳型にして、T7 プライマー (配列番号: 7) と EF1 α プライマー EF1-1R (配列 5'-TGC TAC TGT GTC GGG GTT GTA-3'; 配列番号: 9)、あるいは EF1 α プライマー EF1-3F (配列 5'-CCT GAA CCA TCC AGG CCA AAT-3'; 配列番号: 10) と FL3-705 プライマー (配列番号: 8) の組み合わせで PCR を行った。二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーが回収されていれば、この PCR により、それぞれ EF1 α 遺伝子の 5'末端断片 750 塩基と 3'末端断片 750 塩基の断片が増幅されるはずである。回収した二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリー 6.0 μ l に 10 x PCR バッファー (100 mM トリス塩酸(pH8.3)、500 mM 塩化カリウム、150 mM 塩化マグネシウム) 2.5 μ l、各 25 mM dNTP 2.0 μ l、0.5 pmol/ μ l のプライマー各 0.5 μ l ずつを加え、さらに滅菌水を加えて 24.5 μ l とし、Takara Taq DNA ポリメラーゼ (寶酒造) を 0.5 μ l (2.5U) 加えて PCR を行った。反応はパーキンエルマーモデル 9600 サーマルサイクラーを用い、95°C 5 分保温後、95°C 1 分、58°C 1 分、72°C 1 分の温度条件で 35 サイクル行った。PCR 後、その一部を 2.0 % (w/w) アガロースゲル (TBE バッファー) で電気泳動し、各断片の増幅を調べた (図 8)。その結果、5 回まで繰り返し二次的な完全長 cDNA ライブラリーの複製を行った場合でも、それぞれ EF1 α 遺伝子の 5'末端断片と 3'末端断片が増幅されてくることが確認された。

ジーンプレートから繰り返し複製・回収した二次的な cDNA を鋳型とし、EF1 α 遺伝子の 5'末端断片 (750 塩基) および 3'末端断片 (750 塩基) の増幅を行うことで、二次的な完全長 cDNA ライブラリーが上清に得られていることを示した。5'末端断片 (750 塩基) と 3'末端断片 (750 塩基) のバンドの位置をそれぞれ左側と右側に矢印で示した。各レーンのサンプルの説明は以下に示した。

レーン 1 : サイズマーカー

レーン 2、4、6、8、10 : 一次的な完全長 cDNA を固定化したジーンプレートから繰り返し DNA ポリメラーゼ Klenow 断片反応により複製・回収した二次的な cDNA ライブラリーを鋳型として、EF1 α 遺伝子の 5'末端断片 (750 塩基) を増幅する PCR を行ったもの。

レーン 3、5、7、9、11 : 一次的な完全長 cDNA を固定化したジーンプレートから繰り返し DNA ポリメラーゼ Klenow 断片反応により複製・回収した二次的な cDNA ライブラリーを鋳型として、EF1 α 遺伝子の 3'末端断片 (750 塩基) を増幅する PCR を行ったもの。

レーン 2、3 : ジーンプレート上で行った複製 1 回目の回収溶液を鋳型として PCR を行ったもの。

レーン 4、5 : ジーンプレート上で行った複製 2 回目の回収溶液を鋳型として PCR を行ったもの。

レーン 6、7 : ジーンプレート上で行った複製 3 回目の回収溶液を鋳型として PCR を行ったもの。

レーン 8、9 : ジーンプレート上で行った複製 4 回目の回収溶液を鋳型として PCR を行ったもの。

レーン 10、11 : ジーンプレート上で行った複製 5 回目の回収溶液を鋳型として PCR を行ったもの。

レーン 12 : サイズマーカー

このことで EF1 α 全長 cDNA のセンス鎖の 5'末端がジーンプレートに固定化さ

れていることが確認された。以上の結果から、センス鎖の 5'末端を固定化した一次的な完全長 cDNA ライブラリーのウエル上で、cDNA のセンス鎖側の 5'末端に連結されている T7 配列と 3'末端側に存在するポリ A 部分の配列をプライマーとした DNA ポリメラーゼ Klenow 断片を用いた DNA 複製反応を行うことにより、二次的な二本鎖の完全長 cDNA ライブラリーが得られていることが確認された。

〔実施例 5〕センス鎖の 5'末端側を固定化した一次的な完全長 cDNA ライブラリーを鋳型とした試験管内での RNA 合成

実施例 1 と実施例 2 に示した方法にしたがい、全長 EF1 α 遺伝子を含む DNA 断片を、T7-オリゴキャップリンカープライマ (配列番号：6) をスパーサーを介して固定化したジーンプレート (AGCT, Inc. 製) のウエルに固定化した。このようにして得たジーンプレートのウエルの中で、アンプリスクライプ T7、T3、S P6 ハイイールド・トランスクリプションキット (エピセンター) を用いて、試験管内での RNA 合成反応を行った。試験管内での RNA 合成反応は、キット添付のマニュアルにしたがい、キットに添付されている反応バッファート、終濃度として 7.5 mM ATP、7.5 mM GTP、7.5 mM CTP、7.5 mM UTP、10 mM ジチオスレイトール、5 μ l AmpliScribe T7 酵素溶液を加え、総液量が 50 μ l なるようにして鋳型となる全長の EF1 α 遺伝子を固定化したウエルに加え、37°C で 2 時間反応させた。RNA 合成反応を行った後、ウエルから上清を回収し、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿を行った。こうして得られた反応液の一部を実施例 7 のノザンハイブリダイゼーション実験に供した。

〔実施例 6〕固定化したプレート上で合成した RNA を検出するためのプローブの作製

特願平 10-324201 号 (平成 10 年 11 月 13 日出願) に記載した方法にしたがって、EF1 α 遺伝子の内部配列 (EF1-7R) (配列 5'-TGG TCC ACA AAA CAT T

CT CCT-3'; 配列番号: 11) からなる合成オリゴ DNA のジゴキシゲニン (DIG、ペーリンガー・マンハイム) 標識を行った。100 pmol の合成オリゴ DNA を全量 19 μ l のテリングバッファー[終濃度として 200 mM カコジレート・ナトリウム、25 mM トリス塩酸(pH6.6)、0.25 mg/ml ウシ血清アルブミン溶液、5 mM 塩化コバルト溶液、50 μ M DIG-dUTP 溶液、0.5 mM dITP]に溶解した。これに 1 μ l (2.5U) のターミナルトランスフェラーゼ (ペーリンガー・マンハイム) を加え、37°C で 15 分反応を行った。反応終了後、氷上に移して EDTA (pH8.0) を終濃度として 40 mM となるように加えて反応を停止させた。これに 20 mg/ml のグリコーゲン 0.01 μ l、4 M 塩化リチウム 2.5 μ l、75 μ l のエタノールを加えて、標識したオリゴ DNA を沈殿させ、100 μ l の滅菌水に溶解した。

[実施例 7] 固定化したジーンプレート上で試験管内合成した EF1 α 遺伝子 RNA の検出

ポジティブコントロールにする EF1 α 遺伝子のセンス鎖 RNA を通常の試験管内 RNA 合成で調製した。実施例 1 で作製した全長 EF1 α 遺伝子を含む DNA 断片を TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローン化した。得られた組換えプラスミドの中から、T7 プロモーターの下流に EF1 α が順方向に連結されたプラスミドを選択した。このプラスミドを鋳型として、PCR により T7 プロモーターを上流に持つ EF1 α 全長 cDNA 断片を得た。PCR プライマーには、T7 プライマー (配列番号: 7) と、EF1 α プライマー EF1-8R (配列番号: 5) を用いた。鋳型 DNA 溶液 0.5 μ l (約 10 ng) に 10 x PCR バッファー (100 mM トリス塩酸(pH8.3)、500 mM 塩化カリウム、150 mM 塩化マグネシウム) 5.0 μ l、各 25 mM dNTP 4.0 μ l、5 pmol/ μ l のプライマー各 1.0 μ l ずつを加え、さらに滅菌水を加えて 49 μ l とし、Takara Taq DNA ポリメラーゼ (寶酒造) を 1.0 μ l (5.0U) 加えて PCR を行った。PCR はパーキンエルマーモデル 9600 サーマルサイクラーを用い、95°C 5 分保温後、95°C 1 分、60°C 1 分、72°C 2 分の条件で

30 サイクル反応を行った。この PCR で、T7 プロモーターを上流に持ち EF1 α 遺伝子ほぼ全長を含む 1750 塩基の断片が増幅された。PCR 後、フェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行った後、20 μ l の TE バッファーに溶解した。この全量を 1.0 % (w/w) アガロースゲル (1 xTAE バッファー) で電気泳動し、増幅した DNA 断片をジーンクリーン (バイオ 101) を用いて回収した。回収した断片は 20 μ l の TE バッファーに溶解した。

回収した EF1 α 全長 cDNA 断片溶液に、プロテインナーゼ K (ベーリンガーマンハイム、終濃度 100 μ g/ml) とラウリル硫酸ナトリウム (SDS) (終濃度 0.5 %) を加えて 37°C で 60 分間処理を行った。さらにこれをフェノールクロロホルム処理、エタノール沈殿を行い、回収した DNA を 20 μ l の TE バッファーに溶解した。アンプリスクライプ T7、T3、SP6 ハイイールド・トランスクリプションキット (エビセクター) を用いて、試験管内での RNA 合成反応を行った。試験管内での RNA 合成反応は、キットに添付されている反応バッファーと、終濃度として 7.5 mM ATP、7.5 mM GTP、7.5 mM CTP、7.5 mM UTP、10 mM ジチオスレイトール、5 μ l AmpliScribe T7 酵素溶液を使用し、37°C で 2 時間行った。RNA 合成反応後、フェノールクロロホルム処理とエタノール沈殿を行い、その一部をノザンハイブリダイゼーション実験のポジティブコントロールとして使用した。

試験管内合成した RNA の一部を MOPS バッファー (終濃度で 20 mM MOPS、8 mM 酢酸ナトリウム、1 mM EDTA) を用いて 18 % (v/v) ホルムアルデヒド変性 1.0 % (w/w) アガロースゲル電気泳動を行った。これを 20 x SSC バッファーを用いて Sambrook の「モレキュラークローニング 第二版」(コールドスプリングハーバープレス) の 7.46 に記載されたキャピラリートランスファー法により、ナイロン膜 (ベーリンガーマンハイム) にブロットイングした後、ストラタリンカー UV クロスリンカー (ストラタジーン) を用いて RNA を固定化した。このようにして作製したフィルターを、プレハイブリダイゼーションバッファー

($0.9 \times \text{SSC}$ 、 1% ブロッキングリエージェント、 0.1% N-ラウロイルサルコシン酸ナトリウム、 0.02% SDS) 中で 68°C で 3 時間プレハイブリダイゼーションを行った。プレハイブリダイゼーションバッファーに実施例 6 で DIG によりテール標識した EF1 α 遺伝子のオリゴ DNA プローブを 10 pmol/ml になるように加えたハイブリダイゼーションバッファー中で、さらに 52°C で約 20 時間ハイブリダイゼーションを行った。その後、約 100 ml のハイブリ洗浄バッファー ($0.9 \times \text{SSC}$ 、 0.1% SDS) で 52°C で 15 分間ずつ、2 回洗浄した。こうして得たナイロン膜を DIG ルミネッセンス検出キット (ベーリンガーマンハイム) を用い、キット添付のマニュアルにしたがって固定化ウエル上で合成された EF1 α 遺伝子のセンス鎖 RNA の検出を行った (図 9)。

EF1 α 全長 cDNA のセンス鎖の 5'末端を固定化したジーンプレート上で、試験管内 RNA 合成を行った。コントロールとして、PCR により作製した EF1 α 全長 cDNA の上流に T7 プロモーターをもつ DNA 断片約 50 ng を鋳型として同様の実験を行ったサンプルを流した。いずれも、DNase 処理を行った後、電気泳動を行った。検出されているバンドが RNA であることを証明するため、これらのサンプルを終濃度 $0.2\text{ }\mu\text{g/ml}$ の RNase で 37°C で 10 分間処理したサンプルも泳動した。各レーンのサンプルは以下の通り。

レーン 1 : EF1 α 全長 cDNA のセンス鎖の 5'末端を固定化したジーンプレート上で、試験管内 RNA 合成を行った上清を DNase 処理したもの。

レーン 2 : レーン 1 に流したサンプルと同じものを RNase 処理したもの。

レーン 3 : PCR により作製した EF1 α 全長 cDNA の上流に T7 プロモーターをもつ DNA 断片を鋳型として試験管内 RNA 合成を行った上清を DNase 処理したもの。

レーン 4 : レーン 3 に流したサンプルと同じものを RNase 処理したもの。

レーン 5 : サイズマーカー。

その結果、EF1 α 全長 cDNA のセンス鎖の 5'末端を固定化したジーンプレート

上で RNA 合成反応を行ったサンプルにおいても、通常の試験管内反応で合成した EF1 α センス鎖 RNA と同じ長さのバンドが検出された。このシグナルは RNA 処理によって消失したことから、このバンドが RNA であることを確認した。

産業上の利用の可能性

本発明は、センス鎖 cDNA の 5'側において固定されたまったく新規な構造の cDNA を提供する。この特徴によって、完全長 cDNA の固定化効率が高く、完全長 cDNA の多様性に富んだ固定化 cDNA ライブラリーの提供を可能とする。公知の固定化 cDNA ライブラリーでは、アンチセンス鎖（第 1 鎖）合成用プライマーを固定化する方法でしか固定化できないので、不完全な cDNA を多く含むライブラリーとなっていた。本発明では、第 1 鎖 cDNA（アンチセンス鎖）の 3'側に人為的な既知の塩基配列を付加することにより、結果として高い効率で完全長 cDNA を固定化し、完全長 cDNA の多様性に富んだ固定化 cDNA ライブラリーを合成することが可能となった。

また本発明における人為的に付加した既知の塩基配列には、インビトロで RNA の合成を可能とするプロモーターや、機能性タンパク質をコードする遺伝子を用いることができる。しかも、これらの人為的に付加した既知の塩基配列はセンス鎖（第 2 鎖）の上流に配置されるため、様々な用途をもたらす。たとえばプロモーター配列を利用した場合には、本発明による固定化 cDNA ライブラリーを鋳型とする mRNA ライブラリーの調製が可能である。しかも本発明の cDNA ライブラリーは固定化されていることから、回収・再利用することにより原理的には同等の品質の RNA を無限に生成することも可能である。生成した翻訳開始コドンを含むセンス鎖 RNA は、生物体に導入することにより細胞内でその遺伝子の生物活性を発現させることが可能である。たとえば、特定の状態の生物体から作成した固定化発現 cDNA ライブラリーから作成した発現 RNA ライブラリーは、その状態で発現している遺伝子群に対する生物体の応答を研究解析するための有

用な材料になり得る。

また本発明においてはここで得られる RNA がセンス鎖であることから、インビトロでのタンパク質合成が可能となる。翻訳開始コドンを含む cDNA ライブラリーを固定化できることから、インビトロのタンパク質合成反応により、タンパク質ライブラリーを作成することが可能である。生成したタンパク質ライブラリーは、たとえば、プロテオーム解析のための有用な研究材料となるほか、医薬品をはじめとする種々の生理活性タンパク質の探索源としても利用可能である。インビトロ翻訳系は、微量のタンパク質しか与えないが、一方で生体内のタンパク質合成系と酷似しているため天然の状態に近い状態でタンパク質を発現する。ファージライブラリー等で発現できるタンパク質分子の大きさや種類に制限があるのに対し、インビトロ発現系ではそうした制約が少なく、ライブラリーのようなより広範な遺伝子を対象とした発現に適している。更にプロモーター配列と cDNA の間に、特定のタンパク質をコードする遺伝子を挿入しておけば、固定化 cDNA ライブラリーを鋳型として特定のタンパク質との融合タンパク質遺伝子ライブラリーを作成することも可能となる。

本発明によって提供される cDNA ライブラリーは、これをプライマリーライブラリーとして 2 次的 cDNA ライブラリーの合成が可能である。本発明の cDNA ライブラリーをプライマリーライブラリーとすれば、オリゴ dT と人為的に付加した既知の塩基配列をプライマーとする PCR を行うことより理論的にすべての cDNA が合成される。このようにして合成された cDNA の集合体は、プライマリーライブラリーにおける完全長 cDNA のポピュレーションを反映した良質な 2 次的ライブラリーを与える。しかも本発明のライブラリーは固定化されているので理論的には何度でも再利用することができる。つまり、継続的に完全長 cDNA を多く含む均質なライブラリーの提供が可能となる。公知の方法に基づいて合成された cDNA ライブラリーでは、完全長 cDNA がわずかしか含まれないため、mRNA におけるポピュレーションを維持しながら増幅することが困難とされている。

したがって、本発明の cDNA ライブラリーは cDNA の研究を進める上できわめて有効な手段といえる。

以上のように、センス鎖 RNA ライブラリーの効率的な生産方法として、さらにその cDNA がコードするタンパク質によるライブラリーを構成するための手段として、更に品質の安定した完全長 cDNA ライブラリーを生産する手段として、本発明の産業上の有用性はきわめて高い。

請求の範囲

1. センス鎖 cDNA の 5'側が固定されている cDNA ライブラリー。
2. センス鎖 cDNA の 5'末端に、そのライブラリーを構成する cDNA に共通の塩基配列が存在する請求項 1 に記載の cDNA ライブラリー。
3. 前記共通の塩基配列が、RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーターのセンス配列である請求項 2 に記載の cDNA ライブラリー。
4. 前記共通の塩基配列が、任意のアミノ酸配列をコードするものであり、この塩基配列と cDNA とが同じ読み取り枠を構成する請求項 2 に記載の cDNA ライブラリー。
5. センス鎖 cDNA が翻訳開始コドンを含む請求項 1 に記載の cDNA ライブラリー。
6. 翻訳開始コドンが mRNA に由来するものである請求項 5 に記載の cDNA ライブラリー。
7. 以下の工程を含む cDNA の合成方法であって、第 1 鎖 cDNA が 3'末端に人為的に付加した既知の塩基配列を備え、第 2 鎖合成用プライマーとするオリゴヌクレオチドがその 5'側において固相に結合したものである cDNA の合成方法。
 - a) 第 1 鎖 cDNA 合成用プライマーにより mRNA を鋳型として cDNA の第 1 鎖を合成する工程、
 - b) 工程 a) によって生成する第 1 鎖 cDNA の 3'側に相補的な配列を持つオリゴヌクレオチドを第 2 鎖合成用プライマーとしてセンス鎖 cDNA を合成する工程、
8. 第 1 鎖 cDNA の 3'末端に付加する配列が、以下の工程によって付加されたものである請求項 7 に記載の cDNA の合成方法。
 - a) mRNA の 5'末端に既知の配列を持つオリゴヌクレオチドを結合する工程、

- b) 工程 a) の mRNA を鋳型とし第 1 鎖合成用プライマーによって第 1 鎖 cDNA を合成する工程、
9. 前記工程 a) において、mRNA の 5'末端に存在する CAP 構造を特異的に認識する方法によって前記オリゴヌクレオチドを結合する請求項 8 に記載の cDNA の合成方法。
10. 請求項 7-9 のいずれかに記載の方法によって得ることができるセンス鎖 5'固定化 cDNA。
11. mRNA を材料として請求項 7-9 のいずれかに記載の cDNA の合成方法を実施することによって cDNA ライブラリーを合成する方法。
12. 請求項 11 に記載の方法によって得ることができるセンス鎖 5'固定化 cDNA ライブラリー。
13. mRNA を材料として請求項 9 に記載の cDNA の合成方法を実施することによって得ることができる完全長 cDNA を含む cDNA ライブラリー。
14. 請求項 12 または 13 に記載の cDNA ライブラリーを増幅することによって得ることができる、2 次的 cDNA ライブラリー。
15. 請求項 3 の cDNA ライブラリーを鋳型として、前記 RNA ポリメラーゼにより特異的に認識されるプロモーター配列を認識する DNA 依存型 RNA ポリメラーゼにより RNA を合成し、mRNA ライブラリーを得る方法。
16. 請求項 15 に記載の方法により得ることができる、mRNA ライブラリー。
17. 請求項 16 に記載の mRNA ライブラリーを発現システムに適用することによってタンパク質に翻訳する工程を含むタンパク質ライブラリーの調製方法。
18. 請求項 17 に記載の方法によって得ることができるタンパク質ライブラリー。
19. 下記の工程 a) - c) を含む cDNA のサブトラクション法
- a) テスターとする cDNA ライブラリーを合成する工程、

- b) 請求項 1、1 2、および 1 3 のいずれかに記載のセンス鎖 cDNA ライブラリーをドライバーとし、テスター cDNA をハイブリダイズさせる工程、および
- c) 工程 b) においてハイブリダイズしなかった cDNA またはハイブリダイズした cDNA を選択する工程

1/5

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> Helix Research Institute

株式会社ヘリックス研究所

<120> Immobilized cDNA Library

固定化 c D N A ライブラリー

<130> H1-004PCT

<140>

<141>

<150> JP 1998-262941

<151> 1998-09-17

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Bacteriophage T7

<400> 1

taatacgact cactataggg

2/5

<210> 2

<211> 20

<212> DNA

<213> Bacteriophage T3

<400> 2

aattaaccct cactaaagg

20

<210> 3

<211> 18

<212> DNA

<213> Bacteriophage SP6

<400> 3

atttaggtga cactatag

18

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

agcatcgagt cggccttggt g

21

<210> 5

3/5

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence.

<400> 5

tgggtctcaa aattctgtga c

21

<210> 6

<211> 51

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

gtaatacgac tcactatagg gagcatcgag tcggccttgt tggcctactg g

51

<210> 7

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

4/5

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 7

gtaatacgac tcactatagg g

21

<210> 8

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

gcggctgaag acggcctatg t

21

<210> 9

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

tgctactgtg tcggggttgt a

21

<210> 10

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

cctgaaccat ccaggccaaa t

21

<210> 11

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially
Synthesized Probe Sequence

<400> 11

tgggtccacaa aacattctcc t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP99/04549

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁶ C12N15/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
Int.Cl⁶ C12N15/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Thomas Roeder "Solid-phase cDNA library construction, a versatile approach" Nucleic Acids Research (July, 1998) Vol. 26 No. 14 P.3451-3452	1-19
A	Yasnory F. Sasaki "Construction of a Normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system" Nucleic Acids Research (1994) Vol. 22 No. 6 P.987-992	1-19
A	Masato Mituhasi "Gene manipulation on plastic plates" NATURE (1992) Vol. 357 P.519-520	1-19

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
7 October, 1999 (07. 10. 99)

Date of mailing of the international search report
19 October, 1999 (19. 10. 99)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Thomas Roeder "Solid-phase cDNA library construction, a versatile approach" Nucleic Acids Research (July, 1998) Vol. 26 No. 14 P. 3451-3452	1-19
A	Yasnory F. Sasaki "Construction of a Normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system" Nucleic Acids Research (1994) Vol. 22 No. 6 P. 987-992	1-19
A	Masato Mituhasi "Gene manipulation on plastic plates" NATURE (1992) Vol. 357 P. 519-520	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 99

国際調査報告の発送日

19.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

PCT

REC'D 12 SEP 2000

WIPO

PCT

国際予備審査報告

(法第12条、法施行規則第56条)

〔PCT36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 H1-004PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/ IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/J P99/04549	国際出願日 (日.月.年) 24.08.99	優先日 (日.月.年) 17.09.98
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ¹ C12N 15/00		
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条 (PCT36条) の規定に従い送付する。
2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で <u>3</u> ページからなる。 <input type="checkbox"/> この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び/又はこの国際予備審査機関に対してした訂正を含む明細書、請求の範囲及び/又は図面も添付されている。 (PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照) この附属書類は、全部で _____ ページである。
3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。 I <input checked="" type="checkbox"/> 国際予備審査報告の基礎 II <input type="checkbox"/> 優先権 III <input type="checkbox"/> 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成 IV <input type="checkbox"/> 発明の単一性の欠如 V <input checked="" type="checkbox"/> PCT35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明 VI <input type="checkbox"/> ある種の引用文献 VII <input type="checkbox"/> 国際出願の不備 VIII <input type="checkbox"/> 国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 13.04.00	国際予備審査報告を作成した日 09.08.00	
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/J P) 郵便番号100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 富永 みどり 電話番号 03-3581-1101 内線 3448	4N 9152

I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT 14条)の規定に基づく命令に
応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。
PCT規則70.16, 70.17)

☒ 出願時の国際出願書類

- | | | |
|-------------------------------------|----------------|-----------------------|
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | PCT 19条の規定に基づき補正されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 請求の範囲 | 第 _____ 項、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 図面 | 第 _____ ページ/図、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 出願時に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | 国際予備審査の請求書と共に提出されたもの |
| <input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 | 第 _____ ページ、 | _____ 付の書簡と共に提出されたもの |

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である _____ 語である。

- ☐ 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
☐ PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
☐ 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- ☐ この国際出願に含まれる書面による配列表
☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出された書面による配列表
☐ 出願後に、この国際予備審査(または調査)機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
☐ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記載した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- ☐ 明細書 第 _____ ページ
☐ 請求の範囲 第 _____ 項
☐ 図面 図面の第 _____ ページ/図

5. ☐ この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかったものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならない、本報告に添付する。)

V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条（PCT35条(2)）に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

1. 見解

新規性 (N)

請求の範囲 1-19 有
請求の範囲 無

進歩性 (IS)

請求の範囲 1-19 有
請求の範囲 無

産業上の利用可能性 (IA)

請求の範囲 1-19 有
請求の範囲 無

2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲 1-19

請求の範囲 1-19に係る発明は、国際調査報告で引用された何れの文献にも開示されておらず、新規性及び進歩性を有する。
特に、センス鎖 cDNA の 5' 末端側を固相上に固定化した cDNA は、何れの文献にも開示されておらず、しかもその点は当業者といえども容易に想到し得ないものである。

EP

US

PCT

国際調査報告

(法 8 条、法施行規則第40、41条)

〔PCT 18 条、PCT 規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 H1-004PCT	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(PCT/ISA/220) 及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP99/04549	国際出願日 (日.月.年) 24.08.99	優先日 (日.月.年) 17.09.98
出願人 (氏名又は名称) 株式会社ヘリックス研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT 18 条) の規定に従い出願人に送付する。
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 2 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。

☐ この国際出願に含まれる書面による配列表

☐ この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表

☐ 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表

☐ 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

☒ 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第 I 欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第 II 欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第 III 欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT 規則38.2(b)) の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から 1 カ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

6. 要約書とともに公表される図は、

第 1 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ なし

☒ 出願人は図を示さなかった。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表している。

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ C12N15/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))
Int.Cl⁶ C12N15/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)
WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	Thomas Roeder "Solid-phase cDNA library construction, a versatile approach" Nucleic Acids Research (July, 1998) Vol. 26 No. 14 P. 3451-3452	1-19
A	Yasnory F. Sasaki "Construction of a Normalized cDNA library by introduction of a semi-solid mRNA-cDNA hybridization system" Nucleic Acids Research (1994) Vol. 22 No. 6 P. 987-992	1-19
A	Masato Mituhasi "Gene manipulation on plastic plates" NATURE (1992) Vol. 357 P. 519-520	1-19

☐ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

07. 10. 99

国際調査報告の発送日

19.10.99

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

新見 浩一

4 N

9162

電話番号 03-3581-1101 内線 3488